



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/12, C12P 21/02, C12N 1/21, C07K 14/47, 16/18, G01N 33/53, A01K 67/027, C12P 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/15652</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月1日 (01.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04269</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月22日 (22.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/275302 1997年9月22日 (22.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/J] 〒250-0045 神奈川県小田原市城山3-3-1 Kanagawa, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/J] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: MEGSIN PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 メグシンタンパク質</p> <p>(57) Abstract A gene expressed specifically in mesangial cells. A DNA expressed specifically in mesangial cells; a protein encoded by this DNA; an antibody binding to this protein, etc. These substances are indigenous to mesangial cells and, therefore, useful in, for example, identifying mesangial cells and detecting abnormalities in mesangial cells. Moreover, it is expected that the function of the above protein would contribute to the clarification of the functions of mesangial cells and, in its turn, to the clarification of the causes of diseases relating to mesangial cells. This protein is also expected to be applicable to the treatment, diagnosis, etc. of diseases relating to mesangial cells.</p>		

(57)要約

本発明は、メサンギウム細胞で特異的に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明は、メサンギウム細胞に特異的に発現しているDNA、該DNAのコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等を提供する。これらはメサンギウム細胞特有のものであり、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シェラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴェトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CN 中国	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国	RU ロシア	
EE エストニア	KZ カザフスタン	SD スーダン	
	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

メグシンタンパク質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

背景技術

体内の 60 兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノム DNA を有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型で特異的に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そして、メサンギウム細胞(mesangium cell)は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている。従って、メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thy1 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝子もメサンギウム細胞特異的ではない。このように、メサンギウム細胞で特異的に発現される遺伝子については、従来報告がなかった。

発明の開示

本発明は、メサンギウム細胞で特異的に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者らは、ヒトメサンギウム細胞のインビトロ培養物から mRNA を単離し、3' 側の cDNA ライブラリーを作成した。そして、該 cDNA ライブラリーの中からランダムに多数のクローンの配列を決定し、該塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の 3' 側の cDNA クローンの塩基配列と比較することによって、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そのうち、メサンギウム細胞において最も出現頻度の高い 1 クローンを選択し、5' RACE 法によって完全長 cDNA を単離し（発現産物をヒト MEGSIN と命名）、全塩基配列を決定し、該 cDNA を大腸菌で発現させた（ヒト MEGSIN cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、ヒト MEGSIN の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示す）。そして、SwissProt データベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、MEGSIN が SERPIN スーパーファミリー [R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K. O. Kruithof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Let. 315, 105 (1993)] に属することを見いだした。更に、ノザンブロットティングにより組織分布をみたところ、MEGSIN は、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞特異的に発現していることが確認された。また、IgA 腎症患者と健常人とで腎臓組織中の MEGSIN の発現量を比較したところ、IgA 腎症患者において MEGSIN が有意に発現量が多いことを見いだした。更に、抗 MEGSIN ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作成した。加えて本発明は、マウスとラットにおける MEGSIN のホモログについても、その構造を明らかにした。マウス MEGSIN とラット MEGSIN については、その cDNA の塩基配列を配列番号：3 および配列番号：5 に、そして推定アミノ酸配列を配列番号：4 および配列番号：6 に示した。

即ち、本発明は具体的には以下のものを含む。

〔１〕 配列番号：２、配列番号：４、または配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において１若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

〔２〕 配列番号：２、配列番号：４、および配列番号：６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む〔１〕のタンパク質。

〔３〕 〔１〕に記載のタンパク質をコードするＤＮＡ。

〔４〕 配列番号：１、配列番号：３、および配列番号：５からなる群から選択された塩基配列を含む〔３〕記載のＤＮＡ。

〔５〕 配列番号：１、配列番号：３、および配列番号：５からなる群から選択された塩基配列を持つＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、〔１〕に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするＤＮＡ。

〔６〕 〔３〕、〔４〕、および〔５〕のいずれかに記載のＤＮＡを含むことを特徴とするベクター。

〔７〕 〔３〕、〔４〕、および〔５〕のいずれかに記載のＤＮＡを発現可能に保持する形質転換細胞。

〔８〕 〔７〕に記載の形質転換細胞を培養し、〔３〕、〔４〕、および〔５〕のいずれかに記載のＤＮＡの発現産物を回収することを特徴とする、〔１〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔９〕 〔１〕に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

〔１０〕 配列番号：２、配列番号：４、および配列番号：６に記載されたアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質のエピトープを認識する〔９〕の抗体。

〔１１〕 抗体がモノクローナル抗体である〔１０〕の抗体。

〔12〕〔10〕または〔11〕のいずれかに記載の抗体と〔2〕のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔13〕〔10〕または〔11〕のいずれかに記載の抗体を含む〔2〕のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。

〔14〕生体試料中に含まれる〔2〕のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。

〔15〕メグシンをコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔16〕非ヒト脊椎動物がマウスである〔16〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔17〕メグシンをコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔15〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

なお、全長 cDNA ライブラリーでは、mRNA の部分分解または不完全な第 1 鎖合成のために、同じ転写産物の cDNA の 5'-末端が異なる配列を有することが多い。さらに、その 3'-末端のヌクレオチド配列は、poly(A)におけるプライマー伸長のずれにより、一般的なプライマーを用いたチェーンターミネーション法で決定することが困難である。EST データベースを構築するために用いられているランダムプライム cDNA ライブラリーは、新規な遺伝子を見つけだすのに有用である。しかし、2つの部分配列が一つの遺伝子の異なる部分を形成しているのか、異なる転写産物を形成しているのかが明らかでないため、遺伝子の特徴配列を得るために用いることはできない。従って、本発明者らは、3'-方向領域 cDNA ライブラリーを用いた。この方法により、cDNA の大きさを反映するクローニング効率の変動を回避することができる。3'領域の配列は特有なものであり、約 200～300bp の配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である。

本発明のヒト MEGSIN をコードする DNA は、メサンギウム細胞から mRNA を調製した後、既知の方法により二本鎖 cDNA に変換することにより得ることができる。mRNA の調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger&Birkenmeier, Biochemistry 18, 5143 (1979)] などを用いることができる。全 RNA からの poly(A)⁺RNA の調製はオリゴ (dT) を結合した担体、例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。上記のごとくして得た RNA を鋳型として、3' 端にある poly(A) 鎖に相補的なオリゴ (dT) またはランダムプライマーあるいは MEGSIN のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、このようにして得られた mRNA に相補的な DNA (cDNA) からなるハイブリッドの mRNA 鎖を例えば E. Coli RNase H、E. Coli DNA polymerase I、E. Coli DNA Ligase で処理し、DNA 鎖に置換することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

ヒト MEGSIN 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞 poly(A)⁺RNA を鋳型にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、ヒト MEGSIN 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラットの MEGSIN についても、同様の手法により cDNA の取得が可能である。

あるいは、マウス、ラット MEGSIN cDNA を以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト MEGSIN cDNA より他の SERPIN スーパーファミリーに属するものと比較的高い保存度の高い領域 (197-380A.A.)、保存度が低い領域 (1-196A.A.)、MEGSIN オープンリーディングフレーム全長 cDNA (1-380A.A.) の三種類のプローブを用いて、マウス、ラットの組織、培養メサンギウム細胞から mRNA を抽

出し cDNA ライブラリーを作成することにより、または、市販 cDNA ライブラリー（フナコシ）を用いることによりコロニーハイブリダイゼーションを行うことによって取得することができる。また、同時に、前述プローブ作成と同様に比較的保存度の高い領域（197-380A.A.）、保存度が低い領域（1-196A.A.）でプライマーを作製し、マウス、ラットの組織、培養メサンギウム細胞から抽出した mRNA から RT-PCR 法を用いてクローニングを行うことによりマウス、ラット MEGSINcDNA を取得することができる。また、ゲノムの取得に関しても市販ライブラリー（フナコシ）を用いてヒトの場合と同様の方法でブラークハイブリダイゼーション法を行うことにより取得することができる。

ヒト MEGSIN ゲノムは、ヒト B リンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3 で部分的に切断した DNA をファージベクターである EMBL3 に、もしくは、ヒト X 染色体ライブラリーをファージベクターである Charon35 に組み込んだゲノミックライブラリー（Blood, vol 83, No 11, 1994: pp3126-3131、参照）を用いることにより、既に分かっている MEGSINcDNA のオープンリーディングフレーム全ての領域（1143bp）または cDNA 部分をプライマーとしてヒトゲノム DNA を PCR 法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分をプローブとすることによりブラークハイブリダイゼーション法（新細胞工学実験プロトコル、秀潤社、pp79-92、参照）を行い取得できる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサンギウム細胞由来 mRNA、もしくはヒト腎臓 mRNA（Clontech 社より購入）を鋳型として、5' RACE 法（5'-Full RACE Core Set（宝酒造（株）の方法に従う））を用いて 5' UT 領域の配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencchi, M. D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185(1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られている

ように多形現象を示すことが多く、この多形現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあるが、通常蛋白質の活性は維持される。また、一般に、1個または数個のアミノ酸配列の改変によって、蛋白質の活性が維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

即ち、本発明のタンパク質には、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、SERPIN スーパーファミリーに属するタンパク質が含まれる。ここで、SERPIN スーパーファミリーとは、アンチトロンビン III、ヘパリンコファクターII、 α 1-アンチトリプシン、 α 1-アンチキモトリプシン、プロテインCインヒビター、 α 2-プラスミンインヒビター、C1インヒビターなど、血中の主要なセリンプロテアーゼインヒビターとアミノ酸配列が相互に少なくとも20%同一であるものをいい、必ずしもセリンプロテアーゼ阻害活性を示す必要はない。[R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K. O. Kruithof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Lett. 315, 105 (1993) 参照]

更に、本発明のタンパク質には「配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加、および／または挿入されたアミ

ノ酸配列を含み、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサングウム細胞で発現しているタンパク質」が含まれる。あるいは、「配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、哺乳類メサングウム細胞で特に強く発現しているタンパク質」が含まれる。更に、「配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質」などが含まれる。これらの類似体は、いずれも本発明による MEGSIN を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒト、ラット、およびマウスの MEGSIN のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

また、本発明の DNA には、これらのタンパク質をコードする DNA が含まれる。これらのタンパク質をコードする DNA は、cDNA のみならずゲノム DNA や合成 DNA であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。さらに、これら核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,5662 (1984)] 等に従うことができる。

更に、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5のいずれかに記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が本発明による MEGSIN に特徴的な機能を有する限り、その DNA

は本発明による DNA に含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。

変異体も含め本発明による DNA の塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

このようにしてクローン化された MEGSIN をコードする遺伝子は適当な発現ベクターDNA に組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)]等が、COS細胞の場合はpEF-BOS [Nucleic Acids Research 18, 5322 (1990)]、pSV2-gpt[Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072 (1981)]等が、CHO細胞の場合はpVY1 [国際公開第89/03874号公報]等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合蛋白質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的蛋白質を切り出すことも可能である。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えば COS 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

以上のようにして目的とする MEGSIN をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生された MEGSIN は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的蛋白質である MEGSIN の分離、精製は、通常の蛋白質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定さ

れるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、MEGSINは分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いた MEGSIN の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

この他、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、MEGSIN 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとに、プローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っていることである。設定された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCR のような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 塩基、好適には 25-50 塩基の長さとするのが望ましい。

更に本発明が提供する MEGSIN の cDNA 塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在する MEGSIN 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平 6-181767 号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995),92,3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは 3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域をいう。

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

1) MEGSIN の cDNA の 5' 末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーより MEGSIN のプロモーター領域をクローニングする。

2) 制限酵素消化して MEGSIN 遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分 (2 ~ 5 k b p) のプロモーター領域を含む DNA を得、塩基配列を決定する。ヒトメサンギウム細胞から調製した poly(A)-RNA を鋳型とし、MEGSIN 遺伝子の 5' 末端側 cDNA 配列より選択したプライマー-DNA を用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+ 1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。

3) 2) で得た DNA から MEGSIN 遺伝子のコード領域を除いた DNA 断片をプラスミド上にサブクローニングし、この 2 ~ 5 k b p DNA 断片の下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素 (C A T) 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、P C R により、5' 末端側及び 3' 末端側を順次削った MEGSIN 遺伝子上流部分の様々な部位に該当する DNA 断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としての C A T 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞の C A T 或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、MEGSIN 遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' 非コード領域、イントロン中のエンハンサー領域は、MEGSIN cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト MEGSIN のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

MEGSIN 遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール (秀潤社)」、「バイオマニユアルシリーズ 5 転写因子研究法 (羊土社)」、「DNA & Cell

Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティークラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、ゲルシフト法、または one-hybrid 法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とは MEGSIN 遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。アフィニティークラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有する DNA を用い、結合した転写因子を溶出することによって、MEGSIN 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター、例えば入 gt11 に cDNA を挿入し、 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を合成させ、ニトロセルロース膜に該融合蛋白質を吸着させて、放射性同位元素で標識されたプロモーター領域、エンハンサー領域の DNA 断片をプローブにし、結合活性をもつ融合蛋白質を合成するファージを選択することによって、MEGSIN 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

本発明はまた、MEGSIN を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。MEGSIN または本発明の MEGSIN の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明の MEGSIN、本発明の MEGSIN の部分ペプチド、あるいは本発明による His-Tag-MEGSIN や MBP-MEGSIN のような融合タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

本発明の MEGSIN、または本発明の MEGSIN の部分ペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体又は担体、希釈剤と共に投与される。

投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2～5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化 MEGSIN と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては例えば X-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などが挙げられるが、X-63Ag8 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 20～20 : 1 であり、PEG（好ましくは PEG1000～PEG6000）が 10～80%程度の濃度で添加され、20～40°C、好ましくは 30～37°Cで 1～10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗 MEGSIN 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば MEGSIN 抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗 MEGSIN モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した MEGSIN を加え、固相に結合した抗 MEGSIN モノクローナル抗体を検出する方法など

が挙げられる。

抗 MEGSIN モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは 10~20% の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (大日本製薬 (株))、1~10% の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株))、またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 20~40°C、好ましくは約 37°C である。培養時間は、通常 5 日~3 週間、好ましくは 1 週間~2 週間である。培養は、通常 5% 炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗 MEGSIN 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は好ましくは腹水化して得ることもできる。

本発明によるモノクローナル抗体は、MEGSIN に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 のいずれかに記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも 7 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明における MEGSIN 特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、MEGSIN ファミリーに共通のエピトープを選択するこ

とができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、種間の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗 MEGSIN モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えば DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテイン A またはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られた MEGSIN を認識する本発明によるモノクローナル抗体並びにポリクローナル抗体は、メサングウム細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて MEGSIN を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とにより MEGSIN を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト尿由来 MEGSIN と検体中のヒト尿由来 MEGSIN を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト尿由来 MEGSIN を測定する競合法を利用して検体中のヒト尿由来 MEGSIN を測定することができる。

サンドイッチ法によるヒト尿由来 MEGSIN の測定においては、まず、固定化抗体とヒト尿由来 MEGSIN とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-ヒト尿由来 MEGSIN 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法若しくは固定化抗体、標識化抗体及びヒト尿由来 MEGSIN を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。

抗体を吸着した担体は、適宜アシ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ヒリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジバルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリ

ン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、あるいは ^{35}S 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発

色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- (β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化して MEGSIN の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明における MEGSIN の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、MEGSIN、あるいは MEGSIN の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。これらの生体試料の中でも特に尿においては、メサンギウム細胞の増殖や活性化に伴って高い頻度で MEGSIN が検出されるようになる。したがって、尿中 MEGSIN の測定は、IgA 腎症などのメサンギウム増殖性腎症のマーカーとして有用である。

加えて本発明は、MEGSIN 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非脊椎動物に関する。ここで MEGSIN 遺伝子とは、MEGSIN をコードする cDNA、ゲノム DNA あるいは合成 DNA を含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、MEGSIN の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサンギウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、MEGSIN 遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位 (エンハンサー、プロモーター、イントロン等) の一部に欠失、置換、挿入な

どの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、MEGSIN 遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンス RNA を用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて特定の遺伝子をロックアウトさせた動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法 (マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号)、胚性幹細胞 (ES 細胞) を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989)。

あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系や *Saccharomyces cerevisiae* の FLP リコンビナーゼ系等の *in vivo* において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

本発明のノックアウトマウスは、マウス MEGSIN 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノッ

クアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や 8 細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している 2 つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別には PCR を使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使った PCR 反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、メグシンのアミノ酸配列を示す図である。アンダーライン部は「SERPIN」シグニチャーを示す。四角で囲まれた部分は RSL (reactive center loop) を示し、矢印は予想される反応部位を示す。また、2 つの予想される疎水性領域をそれぞれ点線で示す。

図 2 は MEGSIN と、セルピンスーパーファミリーに属する他のタンパク質とのアミノ酸配列の比較を示す図である。(A) 一致する領域は、棒により示した。棒の隙間は、アラインメントを最適化するために、データベース配列に隙間を挿入した領域を表し、棒を横切る線は、問題の配列と比較してデータベース配列に残基を挿入した領域を表す。これらの配列は、「the protein scoring matrix pam 250」に従い整

列させた。スコアを棒の右に示す(最大可能スコアは1820である)。(B)は、SERPINのRSLの比較を示す図である。RSLのP17-P5'(SchecherとBergerの番号付けによる)を整列させた。非極性残基は太字で示す。「SCC1」は扁平上皮細胞癌抗原1(SCCA1)を、「ILEU」はエラスターゼインヒビターを、「PAI-2」はプラスミノゲン活性化因子阻害剤-2(PAI-2)を、「ova」はオボアルブミンをそれぞれ示す。

図3はMEGSIN転写産物の検出を示すノーザンブロット写真である。各レーンは次の通り。レーン1:メサングウム細胞、レーン2:前骨髄球白血病HL-60、レーン3:Hela細胞S3、レーン4:慢性骨髄性白血病K-562、レーン5:リンパ芽球白血病MOLT-4、レーン6:Burkittリンパ腫Raji、レーン7:大腸腺癌SW480、レーン8:肺癌A549、レーン9:黒色腫G361。実験は、以下のように行った。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓由来の2 μ gのポリ(A)⁺ RNAを含む、ヒトマルチプルノーザンブロット(クロンテック社、米国カリフォルニア州)、前骨髄球白血病HL-60、Hela細胞S3、慢性骨髄性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、バーキット(Burkitt)リンパ腫Raji、結腸直腸腺癌SW480、肺癌A549、および黒色腫G361由来の2 μ gのポリ(A)⁺ RNAを含むヒト癌細胞系ノーザンブロット(クロンテック社、米国カリフォルニア州)を用いた。RNAをヒトメサングウム培養細胞から単離し、ポリ(A)⁺ RNA(2 μ g)を2.2Mホルムアミド含有1%アガロースゲルにて分離し、上記ブロット用フィルターに転写した。そのフィルターを「Rapid Hyb solution (アマシャム社)」中でハイブリダイズした。フィルターを、0.1 \times SSPE/0.1%の最終ストリンジェンシーになるよう、60°Cで洗浄した。

図4は、RT-PCR実験の結果を示す写真である。各レーンは次の通り。レーン1:メサングウム細胞、レーン2:平滑筋細胞、レーン3:繊維芽細胞、レーン4:内皮細胞、レーン5:腎臓上皮細胞、レーン6:ケラチノサイト、レーン7:単球、レーン8:多形核白血球(上の写真)。全RNAを、ヒト培養細胞から単離し「T-Primed-First-Strand」キット(ファルマシアバイオテク(株))を用いて逆転写した。PCR増幅は、DNAサーマルサイクラー(パーキンエルマー社)を用いて、25回実施した。

各サイクルは、メグシンのオリゴヌクレオチドプライマー：センス、5'-ATGATCTCAGCATTGTGAATG-3' およびアンチセンス、5'-ACTGAGGGAGTTGCTTTTCTAC-3' を用いて、94°Cで1分間の変性、60°Cで2分間のアニール化、および72°Cで2分間の伸長を含む。予期される増幅断片サイズは773bpであった。異なる試料間のRNAレベルを比較するために、RNA 内部対照として β アクチンを用いた（下の写真）。PCR産物は、1%アガロースゲルにおける電気泳動により分離した。

図5は、健常者およびIgA腎症患者の糸球体内のメサングウム細胞におけるMEGSINの発現を示すin situ ハイブリダイゼーション写真である。（A）はIgA-N患者の二つの糸球体の写真（40倍）である。細尿管及び間質領域にはMEGSINシグナルは観察されなかった。（B）は倍率80倍の写真である。IgA-N患者の糸球体間質領域にMEGSINシグナルが観察される。（C）は倍率200倍の写真である。メサングウム細胞はMEGSIN陽性であるが、内皮細胞、ポーマン囊細胞はMEGSIN陰性であることが示されている。

図6は、本発明によるMEGSIN特異的なポリクローナル抗体によるウエスタンブロット法の結果を示す写真である。レーン1：MBP、レーン2：MBP-MEGSIN融合タンパク質、レーン3：MBP-PAI II融合タンパク質、レーン4：PAI-I、およびレーン5：アルブミン。

図7は、尿試料中のMEGSINをELISAによって測定した結果を示すグラフである。縦軸は492nmにおける吸光度を、横軸は尿試料の希釈倍数を示す。正常人ではMEGSINが検出されないのに対して、IgA腎症患者の尿（—●—、—■—、—▲—）にはMEGSINが検出される。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

[実施例1] ヒトメサングウム細胞の初代培養

58才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサングウム細胞

を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200 μ m の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100 μ g/ml のコラゲナーゼ (Washington Biochemical 社製) と共に 37°C で 20 分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM Hepes、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products 社, Bedford, MA) および抗生物質 (10mg/ml のペニシリン、ストレプトマイシン、およびフングゾン) を含む培地 199 (Gibco BRL 社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。3 継代目に、メサングウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリブシン、ビュロマイシンおよび D-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories 社, San Francisco, CA)、抗 VLA(very late antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第 VIII 因子 (Dako 社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

[実施例 2] ヒト培養メサングウム細胞からの mRNA の単離

6 継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全 RNA をヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中のメサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC 溶液中で溶解させた。DNA は 18 ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は 5,000 \times g で 90 秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、15°C、125,000 \times g で 24 時間遠心分離した。RNA ペレットを TE バッファーに溶解させた。オリゴ dT セルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)⁺RNA を分離した。

[実施例 3] 3' 方向 cDNA ライブラリーの構築

poly(A)⁺RNA を鋳型として、pUC19 を基礎とするベクタープライマー [Norlander J., et al., Gene, 26, 101-106(1983)] を用いた cDNA 合成を行った。このベクタープライマー DNA は、HincII 末端、および T テールをもつ PstI 末端を有し、MboI 部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第 2 鎖の合成の後、cDNA 配列、

およびベクターの lacZ 遺伝子内の単一 BamHI 部位を、それぞれ MboI および BamHI で切断し、次に、低 DNA 濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA 挿入配列を、pUC19 クローニングサイトに隣接するプライマー(5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'/配列番号: 7 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3'/配列番号: 8) を用いたペアード PCR により増幅させた。得られた短い二本鎖 DNA を、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

[実施例 4] メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者らは、大規模な DNA 配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., submitted; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。ヒト培養メサンギウム細胞の 3' 方向 cDNA ライブラリーの大規模 DNA 配列決定を行い、ランダムに選択した 1836 個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらに FASTA プログラムを用いて DNA データバンク GenBank と比較した。様々な臓器および細胞からの mRNA をドットプロット解析することにより、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者らのメサンギウム細胞 cDNA ライブラリーにのみ検出されるクローンのうち、最も多く存在する一つのクローンが得られた。このクローンは、全 mRNA のうちの 0.3% を含んでいた。

[実施例 5] 5' Race 法による完全鎖長のクローニング

「5'-Full RACE Core Set」(宝酒造(株)製)を用いて、下記の実験を行った。
0.5ml マイクロチューブにヒト培養メサンギウム細胞から調製した poly(A)⁺RNA (0.5μg/μl) 4.0μl、10×RT バッファー 1.5μl、RNase インヒビター (40U/μl) 0.5μl、AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μl) 1μl、5' 末端リン酸化 RT プラ

イマー (5' - pTCAGAGAGGTCATTC/配列番号: 9、200pmol/ μ l) 1 μ l を加え、RNaseFree dH₂O 7 μ l で全量を 15 μ l とした。この反応液を「Takara PCR Thermal Cycler」(宝酒造(株)製)にセットし、30°C10分、50°C60分、80°C2分、4°C10分インキュベーションし、第1鎖 cDNA を得た。

反応液から 15 μ l を 5×ハイブリッド RNA 変性バッファー15 μ l、H₂O 45 μ l を含む 0.5ml マイクロチューブ中に加えた。RNaseH 1 μ l を加え、30°Cで1時間反応を行った。反応終了後、エタノール 150 μ l を加え -70°Cで30分冷却後、遠心し、上清を除去し、沈殿物を集めた。

得られた沈殿物に 5×RNA (ssDNA) ライゲーションバッファー8 μ l、40% PEG #600 20 μ l、H₂O 12 μ l を加え、よく混ぜ、T4 リガーゼを 1 μ l 加えて 16°Cで15時間反応し、環化一本鎖 cDNA を得た。

得られた環化一本鎖 cDNA を TE バッファーで 10 倍希釈したものを鋳型とし、一次 PCR をおこなった。反応条件は、10×LA PCR バッファーII (Mg²⁺plus) 5 μ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 8 μ l、一次 PCR S1 プライマー (5'-TCATTGATGGGTCCTCAA/配列番号: 10、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、一次 PCR A1 プライマー (5'-AGATTCTTGAGCTCAGAT/配列番号: 11、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を 50 μ l とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94°C3分加熱後、94°C30秒、60°C30秒、72°C2分を 25 サイクル反応させた。

一次 PCR 反応溶液から 1 μ l を鋳型とし、10×LA PCR TM バッファー11 (Mg²⁺plus) 5 μ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 8 μ l、二次 PCR S2 プライマー (5'-AATGGTGGCATAAACATG/配列番号: 12、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、二次 PCR A2 プライマー (5'-ACAGACAAATTGAACTTC/配列番号: 13、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を 50 μ l とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94°C30秒、60°C30秒、72°C2分で 30 サイクル反応させた。

0.75%アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液中から 1 μ l を「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen 社)を用いてサブクロ

ーニングし、得られたプラスミドを「pCR-942-5.3」とした。挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

得られた塩基配列は、遺伝子産物の N 末部分をコードする約 600 ヌクレオチドを含み 5' 非翻訳領域として約 400 ヌクレオチドを含んでいた。予想される開始コドン ATG の位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のオープンリーディングフレーム（「the first ATG rule」を満足する）を与えた。MEGSIN cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、MEGSIN の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

〔実施例 6〕蛋白質の発現

翻訳領域を含む遺伝子を得るために、ヒト培養メサンギウム細胞 poly(A)⁺RNA (0.5 μ g/ μ l) 1.0 μ l を鋳型とし、翻訳領域をコードするように設計したプライマー、すなわち、開始コドンを含み 5' 端に制限酵素 EcoRI 認識配列を加えたプライマー (5' -GAATTCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAA/配列番号：14) 及びストップコドンと SalI 認識配列を加えたプライマー (5' -GTCGACTTATCAAGGGCAAGAACTTTGCC/配列番号：15) で PCR 反応をおこなった。反応条件は、10 \times Ex Taq バッファー 5 μ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 8 μ l、PCR プライマー (5' -GTCGACTTATCAAGGGCAAGAACTTTGCC、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、一次 PCR A1 プライマー (5' -GAATTCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAA、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa Ex TaqTM (10U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を 50 μ l とした。

「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94°C 1 分、60°C 2 分、72°C 2 分を 30 サイクル反応させた。0.75% アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液夜中から 1 μ l を「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen 社) を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドを pCR-942CD-11/2 とした。pCR-942CD-11/2 で形質転換した大腸菌 JM109 を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託した (受託番号 FERM BP-6518)。このプラスミドを EcoRI と SalI で切断し、挿入遺伝子を、EcoRI と SalI で切断したマルトース結合蛋白質融合蛋白質発現用ベクター、pMAL-c (New England Biolab 社) と、T4 リガーゼを用い結合し、大腸菌 XL1-Blue を形質転換した。18 時間後、アンピシリン耐性株を 3ml の LB 培養

液に植え、18 時間培養後、ミニプレ法によりプラスミドを抽出し、制限酵素で確認し、発現ベクター、pMAL-MEGSIN を得た。pMAL-MEGSIN で形質転換した大腸菌 XL1-Blue を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託した（受託番号 FERM BP-6517）。

pCR-942CD-11/2 で形質転換した大腸菌 JM109 の国際寄託：

(a)寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-0046）

(b)寄託日（原寄託日） 平成 9 年 9 月 22 日

(c)受託番号 生命研条寄第 6518 号（FERM BP-6518）

pMAL-MEGSIN で形質転換した大腸菌 XL1-Blue の国際寄託：

(a)寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-0046）

(b)寄託日（原寄託日） 平成 9 年 9 月 22 日

(c)受託番号 生命研条寄第 6517 号（FERM BP-6517）

pMAL-MEGSIN で形質転換した大腸菌 XL1-Blue を $100\mu\text{g/ml}$ になるようにアンピシリンを加えた 10ml の LB 培地で 37°C 、18 時間振とう培養し、この培養液を 1l の Rich 増地（1l 中に 10g トリプトン、5g 酵母抽出物、5g NaCl、2g グルコースを含みアンピシリンを $100\mu\text{g/ml}$ になるように加えたもの）に加え 37°C で振とう培養した。濁度計にて約 0.40D（A600）になったところで 0.1M IPTG（isopropyl- β -D-thiogalactoside 1.41g を水 50ml に溶解したもの）3ml を加え、続けて 37°C で振とう培養した。2 時間後、遠心操作（ $4000\text{g} \times 20$ 分）により菌体を集め、50ml の溶解バッファー（10mM Na_2HPO_4 、30mM NaCl、0.25% Tween20, pH7.0）を加えた。よく懸濁し、 -80°C で 18 時間凍結後、ソニケーション（BRANSON 社：SONIFIER250）し、菌体を粉碎した。0.5M になるように NaCl を加え、遠心操作（ $10000\text{g} \times 30$ 分）によ

り上清を集めた。上清に 200ml の 0.25% Tween20/カラムバッファーを加え、あらかじめ 0.25% Tween20/カラムバッファー (0.25% Tween20、10mM リン酸、0.5M NaCl, pH7.2) で平衡化したアミロース樹脂 30ml を充填したカラムにロードした。1ml/分の流速で、100ml の 0.25% Tween20/カラムバッファー、次に 150ml のカラムバッファーで洗った後、マルトースを 10mM になるように加えたカラムバッファー、50ml でアミロース樹脂に結合した融合蛋白質を溶出した。これを限外濾過器 (Amicon stirred-cell concentrator) で約 1mg/ml まで濃縮した。

融合しているマルトース結合蛋白質は以下の方法で酵素により切断除去できる。蛋白質溶液を透析チューブ (分画分子量 3,500) に入れファクターXa バッファー (20mM Tris·Cl、100mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM アジ化ナトリウム) に対して透析する。透析した溶液 200 μ l (1mg/ml) に 10 μ l のファクターXa (200 μ g/ml) を加え、24 時間、室温で反応することにより、マルトース結合蛋白質と目的とする蛋白質との結合部位を特異的に切断する。切断後、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで精製をおこなうことにより目的とする蛋白質が得られる。

←MBP 目的とするタンパク質→

----CTCGGGATCGAGGGAGGATTTTCAGAATTCATGGCC----

----*LeuGlyIleGluGlyArgIleSerGluPheMetAla*----

↑

ファクターXa 認識部位

[実施例 7] メサングウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProt データベースで FASTA プログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、この遺伝子産物が、SERPIN (セリンプロテアーゼインヒビター) スーパーファミリー [R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K.

O. Kruithof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Lett. 315, 105 (1993)] に属するタンパク質と相溶性が高いことが明らかになった。SERPIN スーパーファミリーとは、構造的に関連しているタンパク質群であり、一般的に細胞外の不可逆的なセリンプロテアーゼインヒビターとして機能する。扁平上皮細胞癌抗原 1 (SCCA1) が、メサンギウム特異的遺伝子と最も高い相溶性 (41.2% 同一) を示し、それに SERPIN スーパーファミリーの他のタンパク質、SCCA2 (40.6%)、白血球エステラーゼインヒビター (37.5%)、およびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-2 (PAI-2) (35.2%) が続いた。したがって、本発明者らは、この遺伝子を MEGSIN (mesangial cell-specific gene with a homology to serpin) と名付けた。

MEGSIN のアミノ酸配列をモチーフ検索した (図 1)。まず、COOH 末端に SERPIN の特徴が存在することが明らかになった。また、4 つの推定 N-グリコシル化部位が存在した。明らかな NH₂ 末端シグナルペプチド配列は、見出されなかったが、 α ヘリックス A (アミノ酸 1~16) および α ヘリックス B (アミノ酸 27~44) に、2 つの疎水性領域が存在した。これらは、SERPIN の転移に重要な役割を果たすと考えられる (G. von Heijne et al., J. Biol. Chem. 266, 15240 (1991); D. Belin, Thromb. Haemost. 70, 144 (1993); D. Belin et al., EMBO J. 15, 468 (1996))。いくつかの SERPIN は、 α ヘリックス A および B 中の非分解性内部シグナル配列により、分泌されるかまたは細胞質に存在する二次元的な分子 (dualistic molecule) として存在すると考えられている (R. D. Ye et al., J. Biol. Chem. 263, 4869 (1988); A. Wohlwend et al., J. Immunol. 139, 1278 (1987); A. Wohlwend et al., J. Exp. Med. 165, 320 (1987); C. Genton et al., J. Cell Biol. 104, 705 (1987); P. Milkus et al., Eur. J. Biochem. 218, 1071 (1993))。SERPIN スーパーファミリーの他のタンパク質と比較することにより、アミノ酸 334~352 が反応部位ループ (reactive site loop/RSL) (P16-P5') (P. C. Hopkins et al., Science. 265, 1893 (1994); K. Aertgeerts et al., Nature Struct. Biol. 2, 891 (1995); P. A. Patston et al.,

FEBS Let. 383, 87 (1996); H. T. Wright. BioEssays. 18, 453 (1996)) に相当することが示唆された (図 2)。いくつかの SERPIN は、プロテアーゼ阻害ではなく、ホルモンの輸送または血圧制御のような機能を有するが、MEGSIN がプロテアーゼ阻害を行うことを示す 3 つの証拠が存在する。まず一つとして、MEGSIN の RSL の Peven 残基は、電荷をもたず、小さく、非極性であるが、これは阻害 SERPIN の特徴である。第 2 に、阻害 SERPIN は、ヒンジ領域と呼ばれる RSL の NH₂ 末端領域 (P12-P9) に「Ala-Ala(Thr)-Ala-Ala」なる配列を有する。MEGSIN の RSL の P12-P9 は、「ATAA」である。MEGSIN の RSL の P17-P8 配列 (EGTEATAAT) は、実際、阻害 SERPIN のコンセンサス配列 (EGTEAAAAT) と一致する。第 3 として、RSL の NH₂ 末端側の直前には β シート領域が存在することが知られている。これは、プロテアーゼ阻害に必須であり、適当なコンフォメーションの変化を達成するためヒンジ領域のアミノ酸の大きさと電荷を制限している。MEGSIN には、この β シート領域が保存されている。

RSL (P1 および P1') 内の推定される切断されやすい結合に隣接する残基は、Lys-Gln であり、基質特異性を決定するために重要であると考えられる (T. E. Creighton et al., J. Mol. Biol. 194, 11 (1987); P. Gettins et al., BioEssays. 15, 461 (1993); P. E. Stein et al., Struct. Biol. 2, 96 (1995))。この部位に関連した配列を有している他の阻害 SERPIN は知られていない。Kunitz 型ウシ塩基性プロテアーゼインヒビターのような SERPIN は、P1 に Lys を有しており、トリプシンを強力に阻害することが知られている。MEGSIN の標的セリンプロテアーゼは、したがって、リジン切断プロテアーゼであると考えられる。

[実施例 8] MEGSIN の機能解析 (2) - 組織分布

MEGSIN のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。RNA をヒトメサングウム培養細胞から単離した。培養細胞の poly(A)⁺RNA (5 μ g) を、2.2M ホルムアミドを含む 1% アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターを Rapid Hyb 溶液 (Amersham 社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ブロットは、60°C で、0.1 \times SSPE/0.1% SDS という最終ストリンジ

エンシーで洗浄した。

ヒトの複数の組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞系のノーザンブロットは Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。ヒトの複数の組織のノーザンブロットには、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓の $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺RNA が含まれる。ヒトの癌細胞系のノーザンブロットには、前骨髄球白血病 HL-60、HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、Burkitt リンパ腫 Raji、大腸腺癌 SW480、肺癌 A549、および黒色腫 G361 由来の $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺RNA が含まれる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。

MEGSIN cDNA プロンプを用いたノーザンブロット解析で、メサンギウム培養細胞に単一の転写産物が検出された。他の臓器または細胞系には検出されなかった (図 3)。MEGSIN 転写産物は、ヒト腎臓由来の poly(A)⁺RNA には検出されなかった。その原因の一つは、腎臓には内皮細胞、上皮細胞、および他の様々な細胞が存在し、メサンギウム細胞の数が少ないためと考えられる。

実際、MEGSIN 転写産物は、腎臓組織から RT-PCR により増幅された。RT-PCR は、ヒト培養細胞から単離した全 RNA を鋳型として、「T-Primed-First-Strand kit」(ファルマシアバイオテク (株)) を用いて行った。PCR 増幅は、「DNA Thermal Cycler」(Perkin Elmer Cetus) により、 94°C 1 分、 60°C 2 分、 72°C 2 分を、25 サイクル行った。センスプライマーとして「5'-ATGATCTCAGCATTGTGAATG-3' / 配列番号: 16」、アンチセンスプライマーとして「5'-ACTGAGGGAGTTGCTTTTCTAC-3' / 配列番号: 17」を用いた。増幅された断片の予想サイズは、773bp であった。異なる試料間の RNA レベルを比較することができるよう、 β -アクチンを内部 RNA コントロールとして使用した。PCR 産物は、1%アガロースゲル電気泳動により分離した。MEGSIN 転写産物は、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、ケラチノサイトからは、RT-PCR により増幅されなかった (図 4)。

また、メサンギウム培養細胞は、活性化および／または増殖する時に、特徴的な新たな表現形質を獲得することが知られている (R. J. Johnson et al., J. Am. Soc.

Nephrol. 2 (10 Suppl), S190 (1992); J. Floege et al., Kidney Int. 45, 360 (1994))。したがって、MEGSIN の発現は、メサンギウム細胞が活性化および／または増殖した時にのみノーザンブロット解析により検出可能なレベルにまで増強されるのかもしれない。ヒト腎組織の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果 (下記) は、この仮説と一致していた。

[実施例 9] MEGSIN の機能解析 (3) - IgA 腎症患者と健常人の発現量対比

in situ ハイブリダイゼーションにより、18 人の IgA 腎症 (IgA-N) 患者および 3 人の健常人の腎臓から得られたヒト腎組織で、MEGSIN mRNA 発現を評価した。*in situ* ハイブリダイゼーションは、以前に示した方法により行った (Kidney Int. 52, 111 (1997))。ヒト MEGSIN cDNA の 391~428 位のヌクレオチド配列をプローブとして用いた。IgA-N 患者を、メサンギウムの増殖が主要で糸球体硬化症は少ないグループ (増殖期、n=9)、糸球体の 30%以上が硬化しているグループ (硬化期、n=9) の 2 つのグループに分けた。MEGSIN mRNA は、健常者でも IgA-N でも、糸球体にのみ検出された (図 5A)。糸球体内で、MEGSIN 転写産物はメサンギウム細胞に局在化していた (図 5B および図 5C)。シグナルの特異性を評価するため、ハイブリダイゼーションの前に RNase で組織を前処理すると、MEGSIN プローブで検出されるシグナルの大部分が除去された。また、100 倍過剰の同種または無関係の未標識オリゴヌクレオチドで競合実験を行ったところ、MEGSIN シグナルは、同種オリゴヌクレオチド競合剤で消失したが、非同種オリゴヌクレオチドでは消失しなかった。MEGSIN mRNA 発現を定量化するため、少なくとも 10 個のランダムに選択された糸球体中の核全て、および周囲に陽性細胞質を有する核 (脈管極の切断面) を盲検的に数え、結果を全核の陽性細胞のパーセントとして表した。Mann-Whitney U 検定を統計比較に用いた。増殖期の IgA-N における MEGSIN 陽性細胞は、健常人の腎臓よりも有意に多かった。これらの知見は、本発明者らの、MEGSIN の発現がメサンギウム細胞が活性化および／または増殖したときに増強されるという仮説を立証するものである。

[実施例 10] 抗 MEGSIN 抗体の製造

(1) MEGSIN の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

他のセルピンファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を利用し、MEGSIN に対するポリクローナル抗体を製造した。MEGSIN 蛋白質の N 末端から 342～356 番目のペプチドの N 末端にシステインを含有するペプチド「 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{S}-\text{N}-\text{I}-\text{V}-\text{E}-\text{K}-\text{Q}-\text{L}-\text{P}-\text{Q}-\text{S}-\text{T}-\text{L}-\text{F}-\text{R}-\text{COOH}$ /配列番号：18」を固相ペプチド法により合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシルスクシニミドエステル) を用いてキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合させた。ウサギ 1 匹をフロインド完全アジュバントと混合した KLH 結合ペプチド (200 μg /匹) で皮内免疫した。初回免疫化後、2 週間後、4 週間後、6 週間後にウサギにフロインド不完全アジュバントと混合した KLH 結合ペプチド (200 μg ペプチド/匹) をブースターとして追加免疫した。44 日後、59 日後、64 日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応するか確認するため、酵素免疫測定法 (ELISA) により評価した。合成ペプチドを 1 μg /ウェルで 96 穴マイクロウェルプレート上に被覆し、プレートを洗浄し、そしてウシ血清アルブミンでブロックした。種々の希釈度で血清試料について抗体の反応性を二次抗体として HRP-結合ヤギ抗ウサギ IgG、基質として 0-フェニレンジアミンを用いて測定した。吸光度の測定は反応を停止した後に 492nm の波長で行った。その結果、44 日後、59 日後、64 日後に、それぞれ抗体価が 6,800 倍、20,500 倍、25,400 倍に上昇していることを確認した。得られた抗体はウエスタンブロットにより MEGSIN 融合蛋白質と反応することを確認し、MEGSIN 蛋白質に特異的であることを証明した。ウエスタンブロットの結果は図 6 (anti peptide 342-356) に示した。

(2) MEGSIN の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

(1) と同様に他のセルピンファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を利用し、MEGSIN に対するポリクローナル抗体を製造した。MEGSIN 蛋白質の N 末端から 16～30 番目のペプチドの N 末端にシステインを含有するペプチド(1)「 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{F}-\text{R}-\text{E}-\text{M}-\text{D}-\text{D}-\text{N}-\text{Q}-\text{G}-\text{N}-\text{G}-\text{N}-\text{V}-\text{F}-\text{F}-\text{COOH}$ /配列番号：19」、72～86 番目のペプチドの

N 末端にシステインを含有するペプチド(2)「H₂N-C-S-Q-S-G-L-Q-S-Q-L-K-R-V-F-S-D-COOH/配列番号：20」、および N 末端から 339～354 番目のペプチドの C 末端にシステインを含有するペプチド(3)「H₂N-A-T-G-S-N-I-V-E-K-Q-L-P-Q-S-T-L-C-COOH/配列番号：21」を固相ペプチド法により合成した。これらのペプチドを EMCS (N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide、同仁化学研究所製)を用いてウシサイログロブリン(Sigma 製)と結合させ、0.85%NaCl 溶液で透析後、アジュバントと充分混和して乳化し、ウサギ皮下に投与した。

初回免疫(20μg/羽)の3週間後に2回目の免疫(50μg/羽)を行い、以後2週間毎に4回免疫(50、50、100、200μg/羽)した。アジュバントは初回免疫のみフロインド完全アジュバント(Difco 製)を、2回目以降はフロインド不完全アジュバント(Difco 製)を用いた。41日後及び55日後に、採血で得た血清の抗体価を酵素免疫測定法(ELISA)により評価した。

すなわち、抗原 50ng/ウエルを固相化した 96 穴プレートに連続的に希釈した抗血清を各ウエルに 100μl 加えて一次反応を行い、洗浄後、二次反応として HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG(免疫化学研究所製)を反応させた。洗浄後、基質としてオルトフェニレンジアミン(和光純薬製)を用いて発色させ、吸光度 492nm で測定した(日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250)。

その結果、追加免疫の 55 日後の抗体価は、ペプチド(A)で 6400 倍、ペプチド(B)で 51200 倍に上昇した。また、ペプチド(C)の 41 日後の抗体価は 102400 倍、55 日後の抗体価 204800 倍に上昇していることを確認した。また、得られた各抗体は、ウェスタンブロット法により MBP-MEGSIN 融合蛋白質と反応することを確認し、MEGSIN 蛋白質に特異性を有することを証明した。このときの結果を図 6(peptide 2;72-86, peptide 3;339-354)に示す。MBP-MEGSIN 融合タンパク質に対して特異的な反応が観察された。

(3) MBP-MEGSIN に対するポリクローナル抗体の製造

実施例 6 で得られた濃縮融合蛋白質 MBP-MEGSIN (10mM リン酸ナトリウム、0.5M

NaCl、10mM マルトース) を等量のアジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液 0.5ml を、ニュージーランドホワイトウサギ(雌、約 4000g) の皮下に投与した(20 μ g/匹)。1 回目免疫後、アジュバントと混合した MBP-MEGSIN で、3 週間後(50 μ g/匹)、5 週間後(50 μ g/匹)、7 週間後(50 μ g/匹)、9 週間後(100 μ g/匹)、11 週間後(200 μ g/匹) に追加免疫した。3 回目の免疫後、1 週間後に試験採血を行い、抗体価を測定した結果、204800 倍に上昇していることを確認した。抗体価の測定は、抗原 50ng/ウェルを固相化した 96 穴プレートを用いた EIA によって行った。連続的に希釈した抗血清を各ウェルに 100 μ l ずつ加えて一次反応を行い、上清除去、洗浄後、抗ウサギ IgG Fab'-HRP (IBL、日本) を反応させ、洗浄後、OPD (Sigma, USA) で発色して測定した。また、得られた抗血清は、ウェスタンブロットにより、MBP-MEGSIN と特異的に反応することを確認した。

(4) MBP-MEGSIN に対するモノクローナル抗体の製造

実施例 6 で得られた濃縮融合蛋白質 MBP-MEGSIN (10mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、10mM マルトース) を等量のアジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液を、3 匹の 7 週齢の Balb/c マウスに 27G の注射針にて皮下、皮内注射し、その後 7 日毎にアジュバントを用いて 4 回免疫を行った(1 回目: 20 μ g/匹、2~4 回: 10 μ g/匹)。4 回免疫後、尾静脈より少量採血し、抗体価を測定した。抗体価の測定は、抗原 50ng/ウェルを固相化したイムノプレートを用いた EIA によって行った。次に、マウスの脾臓細胞をミエローマ細胞株 X-63 Ag8 と PEG を用いた常法により細胞融合した。その後、免疫原、MBP、BSAなどを固定化した 96 穴プレートを用いた EIA によってスクリーニングを行い、免疫原に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択することができる。

[実施例 11] MEGSIN に対するモノクローナル抗体の製造

(1) His-Tag-MEGSIN に対するモノクローナル抗体の製造

(a) His-Tag-MEGSIN の発現

翻訳領域を含む遺伝子を得るために、ヒト培養メサンギウム細胞から ISOGEN

(Nippon Gene 製) を用いて total RNA を採取し、逆転写酵素として Super Script II (GIBCO 製) を用いて cDNA を作成した。この cDNA の一部を鋳型とし、翻訳領域をコードするように設計したプライマー、すなわち開始コドンを含み 5' 側末端に制限酵素 BamHI の認識配列を加えたプライマー EX-MEG1-2 (5'-ATCGGATCCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAATGCAGA-3' /配列番号: 22)、並びにストップコドン及び HindIII の認識配列を加えたプライマー EX-MEG2-2 (5'-ATAAGCTTTCATCAAGGGCAAGAACTTTGCCACTGAATAAG-3' /配列番号: 23) を調製した。これらのプライマーを用い、LA Taq (TaKaRa 社) により PCR 反応を行った。

反応条件は、10x LA Taq バッファー 2.5 μ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 4 μ l、25mM 塩化マグネシウム 2.5 μ l、20 μ M の PCR プライマー EX-MEG1-2 及び EX-MEG2-2 各 1 μ l、LA Taq 2.5units、cDNA 並びに滅菌水を加えて全量を 25 μ l とした。

各試薬を Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems 製) にセットし、96°C 3 分間の加熱後、96°C 1 分間、60°C 30 秒間、72°C 2 分間の設定で 35 サイクル反応させた。

反応終了後 PCR 産物を採取し、制限酵素 BamHI (宝酒造製) 及び HindIII (宝酒造製) で処理した後、Ligation kit ver.I (宝酒造製) を用いて pUC18 にサブクローニングした。このプラスミドを少量培養した後、Wizard plus miniprep DNA purification system (Promega 製) を用いて採取して遺伝子配列を確認し、再度 BamHI 及び HindIII で制限酵素処理に付し、蛋白発現用ベクターである ptrcHisA (Invitrogen 製) のマルチクローニングサイトに、Ligation kit ver.I を用いて挿入し、ptrcHisA-MEGSIN を得た。

作製したプラスミドを大腸菌 JM109 に形質転換し、100 μ g/ml のアンピシリンを添加した LB 寒天培地に植菌してアンピシリン耐性株を選択し、100 μ g/ml のアンピシリンを添加した 20ml の LB 培養液に植え 37°C で一晩振盪培養した後、更に 100 μ g/ml のアンピシリンを添加した 20L の LB 培養液に接種して 37°C で 3 から 4 時間振盪培養した。吸光度が約 0.50D (A600) になったところ (島津製作所、BIOSPEC-1600)

で IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactoside : 宝酒造製) を最終濃度が 1mM になるように加え、続けて 37°C で 3 時間振盪培養した。遠心操作により菌体を回収し、PBS で洗浄後、Ni-NTA Spin Kits (QIAGEN 製) を用いて発現蛋白を回収した。詳細は以下の通りである。

まず検体を Buffer A (6M GuHCl, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0) 50ml に懸濁し、室温にて 1 時間攪拌後、10000g、15 分、4°C の条件で遠心して上清を採取した。この上清に、予め Buffer A で平衡化した Ni-NTA 8ml を加え、室温で 1 時間攪拌し、カラムに移した。カラムを 80ml の Buffer A で洗浄後、Buffer B (8M Urea, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0) 20ml で洗浄し、Buffer C (8M Urea, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl, pH 6.3) 20ml で溶出した。以上の方法で発現蛋白を回収した後、溶出画分を SDS-PAGE で確認し、陽性画分を SDS-PAGE で分離、CBB 染色後、目的のバンドを切り出した。切り出したバンドを Protein extraction buffer に浸し蛋白を溶出させた。

(b) His-Tag-MEGSIN に対するモノクローナル抗体の製造

MEGSIN 融合蛋白質を等量のフロイント完全アジュバントと混合し、十分に乳化した。この乳化液を 3 匹の 7 週齢の Balb/c マウスに 27G の注射針にて皮下及び皮内注射し、その後 7 日毎にフロイント不完全アジュバンドを用いて 4 回免疫を行った。抗原量は 1 回目 : 20 μ g/匹、2~4 回目 : 10 μ g/匹とした。4 回免疫後、尾静脈より少量採血し、抗体価を測定した。抗体価は、抗原 50ng/ウェルを固相化した 96 穴プレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA) により評価した。次にマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞株 X-63 Ag8 と PEG を用い、常法により細胞融合した。その後、His-Tag-MEGSIN、ヒスチジン、BSA などを固相化した 96 穴プレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA) やウエスタンブロット法によりスクリーニングし、免疫原に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した。

[実施例 12] ELISA による尿中 MEGSIN の測定

IgA 腎症患者から尿を採取し、遠心後、上清を遠心式限外濾過膜 (ミリボア製ウ

ルトラフリー：分画分子量 5000) を用いて濃縮した。ウサギポリクローナル抗メグシン抗体 (IgG 画分) をコートした 96 穴 ELISA 用プレートの各ウェルに、段階希釈した MBP-MEGSIN 又は濃縮した尿を 50 μ l 分注し、4°C で一夜放置した。PBS (-) で洗浄し、ブロックエース (大日本製薬) を加えてブロッキングした後、0.05% (w/v) Tween 20 含有 PBS (-) (Tween-PBS) で洗浄し、ビオチン標識ウサギポリクローナル抗メグシン抗体を加え、室温で 1 時間放置した。Tween-PBS で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液 (Amersham 製) を各ウェルに 100 μ l/well ずつ加えた。Tween-PBS で洗浄後、オルトフェニレンジアミン発色基質溶液 (和光純薬製) を 100 μ l/well ずつ加えた。室温、暗所で 10~30 分間反応させた後、2M 硫酸を 50 μ l/well ずつ加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (日本モレキュラーデバイス製、SPECTRAmax250) で吸光度 (492nm) を測定し、標準液の検量線から尿中のメグシン濃度を求めた。結果を図 7 に示した。IgA 腎症の患者尿では MEGSIN が検出されている。

[実施例 13] ラット MEGSIN cDNA のクローニング

(1) degenerate PCR による cDNA のクローニング

ISOGEN (Nippon Gene 製) および oligotex を用い、14 継代目のラット培養メサンギウム細胞から mRNA を抽出した。この mRNA を逆転写酵素 SuperScript II (GIBCO 製) を逆転写反応に付し、得られた cDNA を鋳型とした。ヒト MEGSIN の cDNA を元に、degenerate プライマー FY : GTGAATGCTGTGTAAGGCAANTGN/ 配列番号 : 2 4 (172VNAVYFKGK180 に相当)、および R21 : AANAGRAANGGRTTCNGC/配列番号 : 2 5 (R は、A または G : 357ADHPFLF363 に相当) を作製し、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus 製) を用い、94°C45 秒 (変性)、50°C45 秒間 (アニーリング)、72°C2 分 (増幅)、35 サイクルの条件で PCR を行った。

予想される大きさ (576bp) に近い PCR 産物を pCRII ベクター (Clonotech 製) に組み込み、DNA オートシーケンサーを用いたダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

次にラット MEGSIN の 5' 領域を得るために、ラット MEGSIN のクローン断片から遺伝子特異的プライマーを調製し、再度 degenerate PCR を行った。

まず、ヒト MEGSIN をコードする配列の N-末端に対応する degenerate プライマー RM-CtermC1 : ATGGCNTCNGCNGCNGCNGCNAAYGC/配列番号 : 26 (Y は T または C)、並びにラット MEGSIN 特異的 reverse プライマーである RM-MR-A2 : CGACCTCCAGAGGCAATTCCAGAGAGATCAGCCCTGG/配列番号 : 27 および RM-MR-A1 : GTCTTCCAAGCCTACAGATTTCAAGTGGCTCCTC/配列番号 : 28 を作製した。RM-CtermC1 および RM-MR-A2 を用いて、94°C45 秒、55°C45 秒、72°C 1 分、45 サイクルの条件で PCR を行った。次に得られた PCR 産物を鋳型として、RM-CtermC1 および RM-MR-A2 を用いて、94°C45 秒、55°C45 秒、72°C 1 分、25 サイクルの条件で nested PCR を行った。さらに増幅を促進するために、同一のプライマーを用い、94°C30 秒、55°C30 秒、72°C 40 秒、25 サイクルの条件で PCR を繰り返した。

得られた PCR 産物を pGEM-T-easy ベクター (Promega 製) に組み込んだ。DNA 自動配列決定機を用いたダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

(2) 5'-RACE 法および 3'-RACE 法による cDNA のクローニング

MEGSIN の開始コドンおよび終止コドンの部位に mutation の入っていないオープンリーディングフレームを完全に含む配列を決定し、全長の配列を確定するために、Marathon cDNA amplification kit (Clontech 製) を用い、上記で得られた配列を基にデザインされたプライマーを使って、5'-RACE および 3'-RACE 法を行った。5'-RACE には、2 種の遺伝子特異的アンチセンスプライマー RM-PRO1 : GCTCAGGGCAGTGAAGATGCTCAGGGAAGA/配列番号 : 29 および RM-PRO2 : CTGACGTGCACAGTCACCTCGAGCACC/配列番号 : 30 を用いた。一方、3'-RACE には、遺伝子特異的センスプライマー RM-MR-S3 : GAGGTCTCAGAAGAAGGCACTGAGGCAACTGCTGCC/配列番号 : 31 を使用した。こうして得られた配列に基づいて、最終的に配列番号 : 3 に示す 1229bp からなるラット MEGSIN の cDNA 全長の塩基配列をほぼ決定した。

ラット MEGSIN のオープンリーディングフレームを含むクローンを得るために、上

記で得られた配列からデザインされた 2 種の遺伝子特異的プライマー RM-5' UTR-FS2: CTCTATAGGAGACACTTGG/配列番号: 3 2 (センスプライマー) および 3'-UTR-A1: GAAACAAATCAAAGCAAAC/配列番号: 3 3 (アンチセンスプライマー) を使用した。94°C 45 秒 (変性)、50°C で 45 秒 (アニーリング)、72°C 1 分 30 秒 (増幅)、35 サイクルの条件で PCR を実施した。予想される大きさ (約 1300bp) の PCR 産物を pCRII ベクターに組み込んで、ラット MEGSIN のオープンリーディングフレームを含むクローンを単離した。

[実施例 14] マウス MEGSIN cDNA のクローニング

(1) PCR による cDNA のクローニング

ISOGEN (Nippon Gene 製) を用い、9 継代目のマウス培養メサングウム細胞から 10 μ g のトータル RNA を抽出した。この RNA から 20pmol のオリゴ (dT) プライマー (Pharmacia 製) および 200 ユニットの逆転写酵素 SuperScript II (GIBCO 製) を用いて、42°C 50 分、70°C 15 分の条件で逆転写反応に付し、first strand cDNA を合成した。

ヒトおよびラットの MEGSIN の塩基配列を元に、degenerate プライマー MF-1: 5'-GAAATTGAAARCAARCTGASYTTYCAGAAT-3'/配列番号: 3 4 (R は A または G、S は C または G、Y は C または T)、MF-2: 5'-CTGASYTTYCAGAATCTAATGGAMTGGAC-3'/配列番号: 3 5 (S は C または G、Y は C または T、M は A または C)、および MR-4: 5'-GGAYTSAGGRAGTWGCTTTTCWACRATRTT-3'/配列番号: 3 6 (S は C または G、Y は C または T、M は A または C、W は A または T) を作成した。

MF-1 および MR-4 を用いて、94°C 1 分 (変性)、60°C 1 分 (アニーリング)、72°C 30 秒 (増幅)、30 サイクルの条件で PCR を行った。次に得られた PCR 産物を鋳型として、MF-2 および MR-4 を用いて同様の条件で、nested PCR を行い、300bp の cDNA 断片を得た。

(2) RACE 法による 3'-領域の伸長

上記(1) で得られた配列を元に、遺伝子特異的プライマーである MMF3: 5'-

GAGGTCTCAGAGGAGGGCACTGAAGCCACTGCTGCC-3' /配列番号：37、および MMF4：5'-CCAGTGCAGATCTCTCTGGAATTGCCTCTGGAGGTCGTC-3' /配列番号：38 を作製した。

1.57 μ g の poly(A)⁺mRNA を用い、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH 製) を使用し、RACE 法による 3'-領域の伸長を行い (PCR: MMF4 および AP-1、nested PCR: MMF3 および AP-2)、新たに 127bp の cDNA 断片を得た。

(3) 5'-領域の伸長

20 μ g のトータル RNA および逆転写酵素 SuperScript II (GIBCO 製) を用いて、firststrand cDNA を合成した。遺伝子特異的プライマーである MMR6：5'-GCCTGTACTGTATAGGAAACCAACCG-3' /配列番号：39、およびラット MEGSIN の塩基配列を元にした degenerate プライマー DG-RMF1：5'-ATGGCYTCCCTYGCTGCGCRAATGCAGARTTTKGC-3' /配列番号：40 (Y は C または T、W は A または T、R は A または G、K は G または T) を用いて PCR を行い、新たに 5'-領域の 720bp の cDNA 断片を得、合計 1147bp (配列番号：5) の cDNA の塩基配列を決定した。得られた cDNA 塩基配列に基づく推定アミノ酸配列 (配列番号：6) をラットのそれ (配列番号：4) と比較すると、マウスのアミノ酸配列における N 末端部分がラットの 13 以降に一致している。このことから、マウスの cDNA は更に 5' 側に翻訳開始点を持つものと推測された。

[実施例 15] トランスジェニックマウスの作製

(1) pUC-MEGSIN の作製

ヒト培養メサングウム細胞から AGPC 法により mRNA を抽出した。これを鋳型とし、センスプライマー 5' Bam-MEG：5'-ATCGGATCCATGGCCTCCCTTGCT-3' /配列番号：41 (BamHI 切断部位を含む。)、及びアンチセンスプライマー 3' Hind-MEG：5'-ATAAGCTTTCATCATCAAGGGCAAG-3' /配列番号：42 (HindIII 切断部位を含む。) を用い RT-PCR 法を行い、MEGSIN のオープンリーディングフレームの完全長を増幅した。

得られた PCR 産物は BamHI 及び HindIII で切断後、BamHI 及び HindIII により切断処理された pUC18 (宝酒造製) とライゲーションして、MEGSIN の全長オープン

リーディングフレームが挿入された pUC18 (pUC-MEGSIN) を作製した。なお、pUC18 に挿入された MEGSIN の塩基配列は、デオキシターミネーション法により確認した。

(2) 遺伝子の構築

ヒト MEGSIN cDNA の開始コドン上流にオリゴヌクレオチド (5'-GCC GCC) を付加するため、以下の条件で PCR を行い、211bp の DNA を合成した。

すなわち、(1) で得られた pUC-MEGSIN を鋳型とし、センスプライマー B44F : 5'-ATGGATCCGCCGCCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAATGCAGAG-3' / 配列番号 : 43 (BamHI 切断部位を含む。)、及びアンチセンスプライマー H30-R : 5'-TATCCTGAGGCAGTGTAAACAAGCAAC-3' / 配列番号 : 44 (HpaI 切断部位を含む。) のセットを用い、TaKaRa Ex.Taq. (宝酒造製) を用いて、PCR を行った。エタノール沈殿により脱塩した後、BamHI 及び HpaI を用いて切断部位を作製し、191bp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により回収した。

pUC-MEGSIN より BamHI 及び HpaI を用いて pUC18 を含む 3.5kb の断片を得、アガロースゲル電気泳動により精製し回収した。これに上記の 191bp の DNA 断片とをライゲーションすることにより、オリゴヌクレオチドが付加したヒト MEGSIN cDNA を含む組換えプラスミド、すなわち pUC-New MEGSIN を作製し、大腸菌 JM109 に形質転換しクローニングした。そして、pUC-New MEGSIN より BamHI 及び HindIII を用いて 1.2kb の断片をアガロースゲル電気泳動により回収した。この断片の末端を TaKaRa Blunting Kit (宝酒造製) を用いて平滑化した。pBsCAG-2 (pCAGGS から SalI 及び PstI を用いて断片を得、pBluescript II SK-の SalI 及び PstI 切断部位に導入したものを) を EcoRI により切断して直鎖にした後、TaKaRa Blunting Kit (宝酒造製) を用いて末端を平滑化し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造製) により脱リン酸化処理を行った。このプラスミドに上記の 1.2kb の断片をライゲーションして組換えプラスミドを作製し、大腸菌 JM109 に形質転換しクローニングした。挿入されたヒト MEGSIN cDNA の方向性が chicken beta-actin promoter と同じクローンをシーケンシングにより選抜し、この組換えプラスミドを pBsCAG-2/MEGSIN とした。

pBsCAG-2/MEGSIN より SalI 及び NotI を用いて 3.4kb の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により回収した。

(3) トランスジェニックマウスの作製

(2) で調製した DNA (3.4kb) の 2 μ l (2000 コピー) をマウス (B6C3F1 \times C57/BL) の受精卵の前核にマイクロインジェクションし、以下に示すサザンハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

QIAGEN TISSUE KIT を用い、マウスの尾からゲノム DNA を調製した。2 μ g のゲノム DNA を PstI により完全消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動により分離した後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。1100bp の DNA 断片 (pUC-MEGSIN より PstI 及び HindIII を用いて切り出し、アガロースゲルで回収したもの) を Random Primer DNALabeling kit Ver.2 (宝酒造製) により調製した[³²P]-dCTP ラベルのプロブを用いて 68°C で 2 時間のハイブリダイゼーションを行った。

メンブレンは最終的に 0.2 \times SSC/0.1%SDS にまで洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。1700bp の特異的なバンドの出現により挿入 DNA 断片の有無、及びコピー数を判定した。複数の挿入 DNA 断片がタンデムに存在する場合の方向性は、2 μ g のゲノム DNA を EcoRV により完全消化し、以下同様の操作を行うことにより決定した。

得られたトランスジェニックマウス (F0) は正常のマウスと交配に供された。誕生したマウスを上述の方法でスクリーニングすることにより、トランスジェニックマウス (F1) を得た。次に同じヘテロ変異を有するトランスジェニックマウス (F1) 同士を交配することにより F2 マウスを得、スクリーニングによりホモ変異を有するトランスジェニックマウス (F2) を得た。

産業上の利用の可能性

本発明により、メサンギウム細胞に特異的に発現している DNA、該 DNA のコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサンギ

ウム細胞特有のものであり、メサングウム細胞の同定、メサングウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサングウム細胞の機能が明らかになり、メサングウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサングウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

請求の範囲

1. 配列番号：2、配列番号：4、または配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
2. 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む請求項1のタンパク質。
3. 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択された塩基配列を含む請求項3記載のDNA。
5. 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択された塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項1に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。
6. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。
7. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。
8. 請求項7に記載の形質転換細胞を培養し、請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質の製造方法。
9. 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。
10. 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6に記載されたアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質のエピトープを認識する請求項9の抗体。

- 1 1 . 抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 0 の抗体。
- 1 2 . 請求項 1 0 または請求項 1 1 のいずれかに記載の抗体と請求項 2 のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項 2 のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
- 1 3 . 請求項 1 0 または請求項 1 1 のいずれかに記載の抗体を含む請求項 2 のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。
- 1 4 . 生体試料中に含まれる請求項 2 のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。
- 1 5 . メグシンをコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
- 1 6 . 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項 1 5 のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
- 1 7 . メグシンをコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項 1 6 のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

1/7

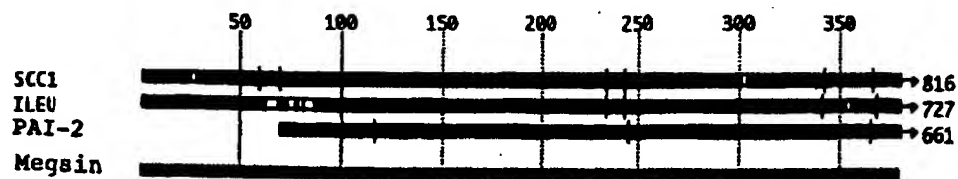
☒ 1

M A S L A A A N A E F C F N L F R E M D	20
D N Q G N G N V F F S S L S L F A A L A	40
L V R L G A Q D D S L S Q I D K L L H V	60
N T A S G Y G N S S N S Q S G L Q S Q L	80
K R V F S D I N A S H K D Y D L S I V N	100
G L F A E K V Y G F H K D Y I E C A E K	120
L Y D A K V E R V D F T N H L E D T R R	140
N I N K W V E N E T H G K I K N V I G E	160
G G I S S S A V M V L V N A V Y F K G K	180
W Q S A F T K S E T I N C H F K S P K C	200
S G K A V A M M H Q E R K F N L S V I E	220
D P S M K I L E L R Y N G G I N M Y V L	240
L P E N D L S E I E N K L T F Q N L M E	260
W T N P R R M T S K Y V E V F F P Q F K	280
I E K N Y E M K Q Y L R A L G L K D I F	300
D E S K A D L S G I A S G G R L Y I S R	320
M M H K S Y I E V T E E G T E A T A A T	340
G S N I V E K Q L P Q S T L F R A D H P	360
F L F V I R K D D I I L F S G K V S C P	380

2/7

2

(A)

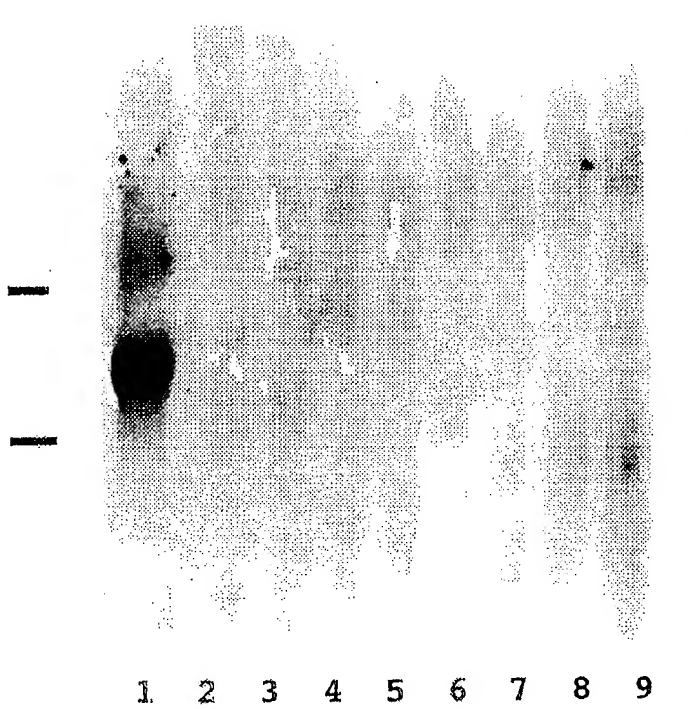


(B)

megsin	E E G T E A T A A T G S N I V E K Q L P Q
SCC1	E E G A E A A A A T A V V G F G S S P T S
ILEU	E E G T E A A A A T A G I A T F C N L M P
PAI-2	E E G T E A A A G T G G V M T G R T G H G
OVA	E A G R E V V G S A E A G V D A A S V S -

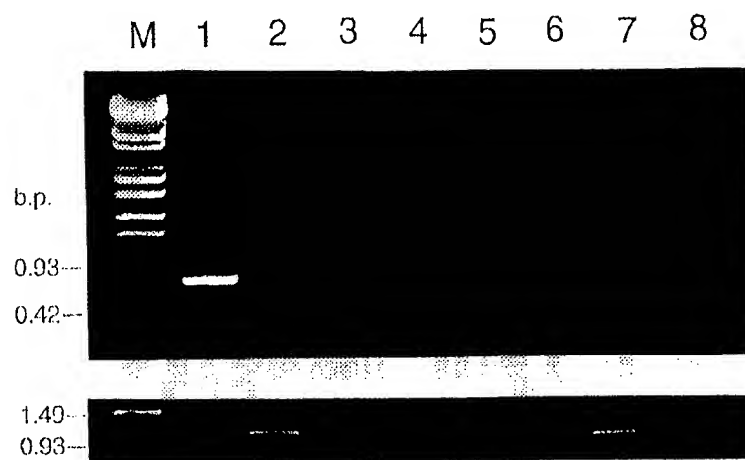
3/7

☒ 3



4/7

図 4



5/7

図 5



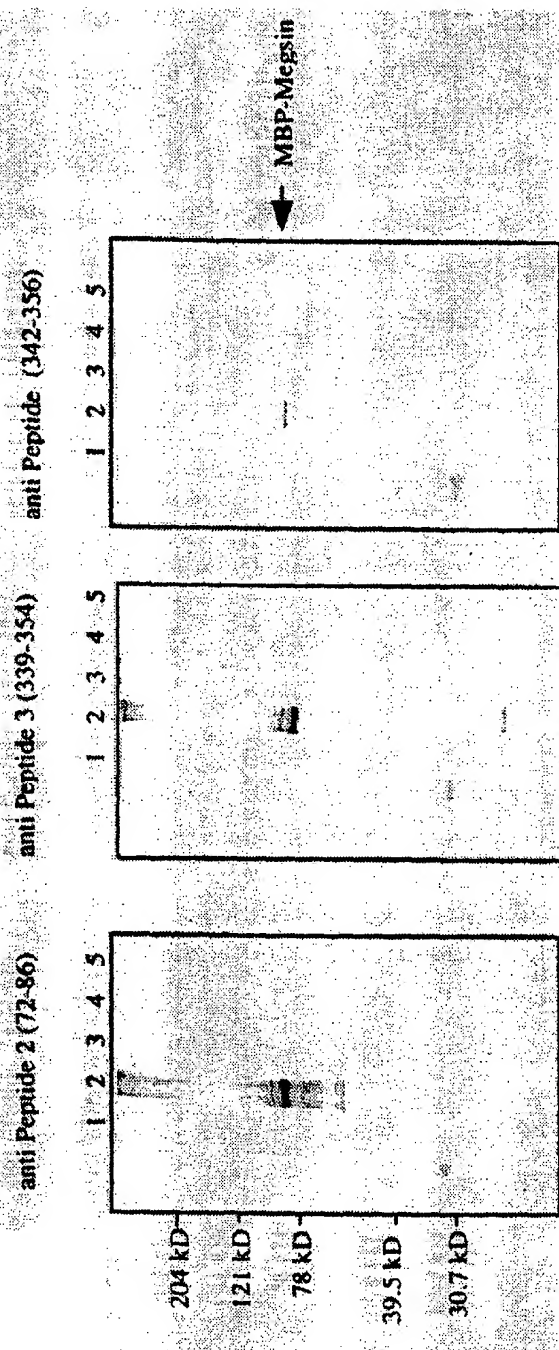
A

B

C

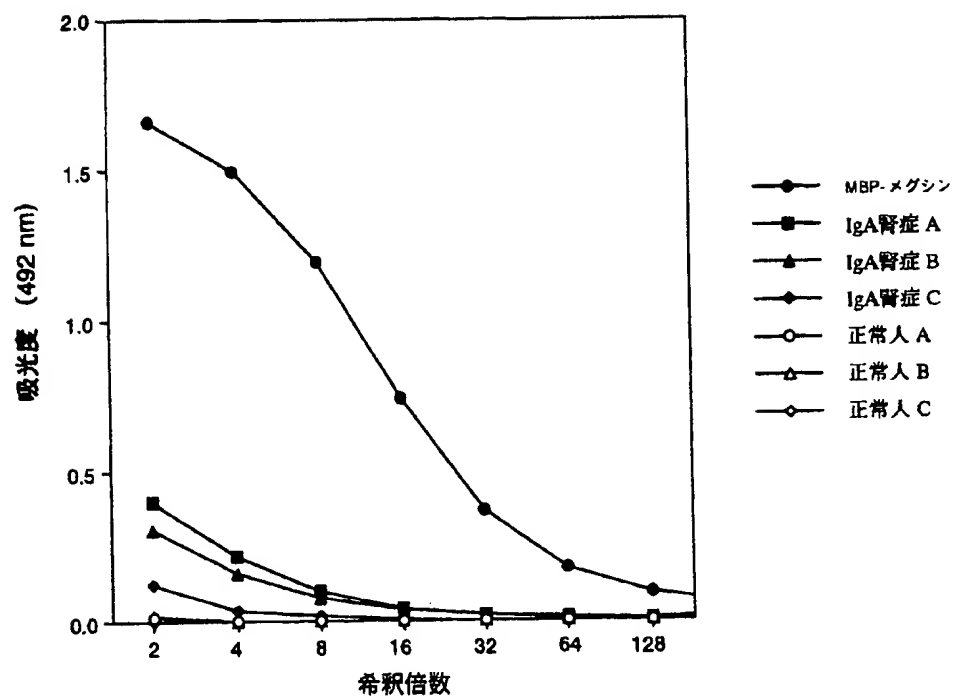
6/7

6



7/7

図 7



1/40
SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio

KUROKAWA, Kiyoshi

宮田 敏男

黒川 清

<120> Megsin Protein

メグシンタンパク質

<130> F2-002PCT

<140>

<141>

<150> JP09-275302

<151> 1997-09-22

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

2/40

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

<400> 1

atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gag ttt tgc ttc aac ctg ttc 48

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1 5 10 15

aga gag atg gat gac aat caa gga aat gga aat gtg ttc ttt tcc tct 96

Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20 25 30

ctg agc ctc ttc gct gcc ctg gcc ctg gtc cgc ttg ggc gct caa gat 144

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp

35 40 45

gac tcc ctc tct cag att gat aag ttg ctt cat gtt aac act gcc tca 192

Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser

50 55 60

gga tat gga aac tct tct aat agt cag tca ggg ctc cag tct caa ctg 240

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65 70 75 80

aaa aga gtt ttt tct gat ata aat gca tcc cac aag gat tat gat ctc 288

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu

3/40

85

90

95

agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag 336

Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys

100

105

110

gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga 384

Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag 432

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys

130

135

140

tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa 480

Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu

145

150

155

160

ggc ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac 528

Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165

170

175

ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat 576

Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn

180

185

190

4/40

tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg 624

Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met

195

200

205

cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg 672

His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met

210

215

220

aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg 720

Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu

225

230

235

240

ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag 768

Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln

245

250

255

aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt 816

Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val

260

265

270

gag gta ttt ttt cct cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg aaa 864

Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys

275

280

285

caa tat ttg aga gcc cta ggg ctg aaa gat atc ttt gat gaa tcc aaa 912

Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys

5/40

290

295

300

gca gat ctc tct ggg att gct tcg ggg ggt cgt ctg tat ata tca agg 960

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg

305

310

315

320

atg atg cac aaa tct tac ata gag gtc act gag gag ggc acc gag gct 1008

Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala

325

330

335

act gct gcc aca gga agt aat att gta gaa aag caa ctc cct cag tcc 1056

Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser

340

345

350

acg ctg ttt aga gct gac cac cca ttc cta ttt gtt atc agg aag gat 1104

Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp

355

360

365

gac atc atc tta ttc agt ggc aaa gtt tct tgc cct tga 1143

Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 2

<211> 380

<212> PRT

6/40

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp

35 40 45

Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser

50 55 60

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65 70 75 80

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu

85 90 95

Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys

100 105 110

Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115 120 125

7/40

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys

130

135

140

Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu

145

150

155

160

Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165

170

175

Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn

180

185

190

Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met

195

200

205

His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met

210

215

220

Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu

225

230

235

240

Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln

245

250

255

Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val

8/40

260

265

270

Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys

275

280

285

Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys

290

295

300

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg

305

310

315

320

Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala

325

330

335

Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser

340

345

350

Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp

355

360

365

Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 3

<211> 1229

9/40

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(1147)

<400> 3

tttcaaa atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac 49

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp

1 5 10

tta ttc aga gag atg gat agt agt caa gga aac gga aat gta ttc ttc 97

Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe

15 20 25 30

tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg agc cta atc cgt ttg ggt gct 145

Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala

35 40 45

cga ggt gac tgt nnn cgt cag att gac aag gcc ctg cac ttt atc tcc 193

Arg Gly Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser

50 55 60

cca tca aga caa ggg aat tca tcg aac agt cag cta gga ctg caa tat 241

Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr

10/40

65	70	75	
caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat nnn 289			
Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa			
80	85	90	
aaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt 337			
Lys Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe			
95	100	105	110
cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg 385			
His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val			
115	120	125	
gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att 433			
Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile			
130	135	140	
aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg 481			
Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu			
145	150	155	
ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct 529			
Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala			
160	165	170	

11/40

gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tcg gcc ttc acc aag agt gat acc 577

Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr

175 180 185 190

ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat 625

Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn

195 200 205

atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca 673

Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro

210 215 220

cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac 721

Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr

225 230 235

atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt 769

Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser

240 245 250

ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag 817

Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln

255 260 265 270

tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa 865

Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu

12/40

275

280

285

atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag 913

Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu

290

295

300

tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta 961

Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val

305

310

315

tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc 1009

Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr

320

325

330

gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct 1057

Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro

335

340

345

350

gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg 1105

Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg

355

360

365

aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct 1147

Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

13/40

tgaaattcta ttggttttc catacactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag 1207

aattgtaatt ggaagtacat gg

1229

<210> 4

<211> 380

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 4

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe

1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly

35 40 45

Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser Pro Ser

50 55 60

Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr Gln Leu

65 70 75 80

14/40

Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa Lys Leu

85

90

95

Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe His Lys

100

105

110

Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys

130

135

140

Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp

145

150

155

160

Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165

170

175

Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr Leu Ser

180

185

190

Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn Met Met

195

200

205

His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro Pro Met

210

215

220

15/40

Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met
225 230 235 240

Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln
 245 250 255

Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val
 260 265 270

Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu Met Arg
 275 280 285

Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu Ser Arg
 290 295 300

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys
305 310 315 320

Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala
 325 330 335

Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser
 340 345 350

Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asn

16/40

355

360

365

Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 5

<211> 1147

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1104)

<400> 5

ttc gac tta ttc aga gag atg gat agt agc caa gga aat gga aat gta 48

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val

1

5

10

15

ttc ttc tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg acc cta atc cgt ctg 96

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu

20

25

30

ggc gct cga ggt gac tgt gca cgt cag att gac aag gca ctg cac ttt 144

Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe

17/40

35	40	45	
aac ata cca tca aga caa gga aac tca tct aat aat cag cca gga ctt 192			
Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu			
50	55	60	
cag tat caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag 240			
Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys			
65	70	75	80
gat tat gaa ctc agc att gcc act gga gtt ttt gca gaa aaa gtc tat 288			
Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr			
85	90	95	
gac ttt cat aag aac tac att gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct 336			
Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala			
100	105	110	
aaa gtg gaa aga gtt gac ttc aca aat gat gta caa gat acc aga ttt 384			
Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe			
115	120	125	
aaa att aat aaa tgg att gaa aat gag aca cat gga aag atc aag aag 432			
Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys			
130	135	140	

18/40

gtg ttg ggc gac agc agc ctc agc tcg tcg gct gtc atg gtg ctg gtg 480

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val

145 150 155 160

aac gct gtt tac ttc aaa ggc aaa tgg aaa tcg gcc ttc acc aag act 528

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr

165 170 175

gat acc ctc agt tgc cgt ttt agg tct ccc acg tgt cct gga aaa gta 576

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val

180 185 190

gtt aat atg atg cat caa gaa cgg cgg ttc aat ttg tct acc att cag 624

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln

195 200 205

cag cca cca atg cag gtt ctt gag ctc caa tat cat ggt ggc ata agc 672

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser

210 215 220

atg tac att atg ctg cct gag gat ggc cta tgt gaa att gaa agc aag 720

Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys

225 230 235 240

ctg agt ttc cag aat ctg atg gac tgg acc aat agg agg aaa atg aaa 768

Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys

19/40

245

250

255

tct cag tat gtg aac gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aag aat 816

Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn

260

265

270

tat gaa atg acg cac cac ttg aaa tcc tta ggc ttg aaa gat atc ttt 864

Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe

275

280

285

gat gag tcc agt gca gat ctc tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc 912

Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu

290

295

300

tac gta tca aag cta atg cac aag tca ttc ata gag gtc tca gag gag 960

Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu

305

310

315

320

ggc act gaa gcc act gct gcc aca gaa aat aac att gtt gaa aag cag 1008

Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln

325

330

335

ott cct gag tcc aca gtg ttc aga gcc gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc 1056

Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val

340

345

350

20/40

atc aag aag aat gac atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tct tgt cct 1104

Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

355

360

365

tgaaattcga ttggtttcc tatacagtaa caggcatcaa gaa

1147

<210> 6

<211> 368

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val

1

5

10

15

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu

20

25

30

Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe

35

40

45

Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu

50

55

60

Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys

21/40

65 70 75 80

Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr

85 90 95

Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala

100 105 110

Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe

115 120 125

Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys

130 135 140

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val

145 150 155 160

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr

165 170 175

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val

180 185 190

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln

195 200 205

22/40

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser

210

215

220

Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys

225

230

235

240

Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys

245

250

255

Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn

260

265

270

Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe

275

280

285

Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu

290

295

300

Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu

305

310

315

320

Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln

325

330

335

Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val

340

345

350

23/40

Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

355

360

365

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 7

tgtaaacga cgccagt

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 8

24/40

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 9

tcagagaggt cattc

15

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 10

tcattgatgg gtcctcaa

18

25/40

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 11

agattcttga gctcagat

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 12

aatggtggca taaacatg

18

<210> 13

26/40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 13

acagacaaat tgaacttc

18

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 14

gaattcatgg cctcccttgc tgcagcaaa

29

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

27/40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 15

gtcgacttat caagggaag aaactttgcc

30

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 16

atgatctcag cattgtgaat g

21

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

28/40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 17

actgaggag ttgctttct ac

22

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 18

Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr Leu Phe Arg

1

5

10

15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

29/40

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 19

Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 20

Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val Phe Ser Asp

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30/40

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 21

Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr Leu

1

5

10

15

<210> 22

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 22

atcggatcca tggcctccct tgctgcagca aatgcaga

38

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

31/40

<400> 23

ataagctttc atcaaggga agaaactttg cactgaata ag

42

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 24

gtgaatgctg tgtacttaaa ggcaantgn

29

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 25

32/40

aanagraang grtcngc

17

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 26

atggcntcng cngcngcngc naaygc

26

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 27

cgacctccag aggcaattcc agagagatca gccctgg

37

33/40

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 28

gtcttccaag cctacagatt tcaagtggt cctc

34

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 29

gctcagggca gtgaagatgc tcaggaaga

30

<210> 30

34/40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 30

ctgacgtgca cagtcacctc gagcacc

27

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 31

gaggtctcag aagaaggcac tgaggcaact gctgcc

36

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

35/40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 32

ctctatagga gacacttg

19

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 33

gaaacaaatc aaagcaaac

19

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

36/40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 34

gaaattgaaa rcaarctgas yttcagaat

30

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 35

ctgasyttyc agaatactaat ggamtggac

29

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

37/40

<400> 36

ggaytsaggr agtwgctttt cwacratrtt

30

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 37

gaggtctcag aggagggcac tgaagccact gctgcc

36

<210> 38

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 38

38/40

ccagtgcaga tctctctgga attgcctctg gaggtcgtc

39

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 39

gcctgttact gtataggaaa ccaaaccg

28

<210> 40

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 40

atggcytccc tygctgcwgc raatgcagar tttkgc

36

39/40

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 41

atcggatcca tggcctccct tgct

24

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 42

ataagctttc atcatcaagg gcaag

25

<210> 43

40/40

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 43

atggatccgc cgccatggcc tcccttgctg cagcaaatgc agag

44

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 44

tatactgagg cagtgttaac aagcaac

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47, C07K16/18,
G01N33/53, A01K67/027, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47, C07K16/18,
G01N33/53, A01K67/027, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Miyata, T. et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy" J. Clin. Invest. (1998) Vol. 102, No. 4 p.828-836	1-13, 15-17
PX	Miyata, T. et al., "Transcriptional Regulation of a Mesangium-Predominant gene, Megsin" J. Am. Soc. Neph. (program and abstr. issue) (1997, Oct.) Vol. 9 p.503A	1-13, 15-17
X	JP, 6-313000, A (Suntory Ltd.), 8 November, 1994 (08. 11. 94) & EP, 583884, A1 & AU, 9341908, A & CA, 2100690, A & HU, 67124, T & AU, 9675387, A & EP, 583884, B1 & DE, 69314574, E & ES, 2108228, T3	1-13, 15-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 10 December, 1998 (10. 12. 98)

Date of mailing of the international search report
 22 December, 1998 (22. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04269

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 is an invention relating to a method for detecting mesangium proliferating nephropathy and thus falls under the category of an invention pertaining substantially to diagnostic methods practised on the human or animal body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47,
C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47,
C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Miyata, T. et al. "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy" J. Clin. Invest. (1998) 第102巻 第4号 p. 828-836	1-13, 15-17
PX	Miyata, T. et al. "Transcriptional Regulation of a Mesangium-Predominant gene, Megsin" J. Am. Soc. Neph. (program and abstr. issue) (1997, Oct.) 第9巻 p. 503A	1-13, 15-17
X	JP, 6-313000, A (サントリー株式会社) 8.11月. 1994 (08.11.94) & EP, 583884, A1 & AU, 9341908, A & CA, 2100690, A & HU, 67124, T & A U, 9675387, A & EP, 583884, B1 & DE, 69314574, E & ES, 2108228, T3	1-13, 15-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 1 4 は、メサンギウム増殖性腎症の検出方法に係る発明であるが、これは実質的に人又は動物における診断方法に係る発明に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。